

WSPÓLZALEŻNOŚĆ POMIĘDZY METYLACJĄ CYTOZYNY I MODYFIKACJAMI CHROMATYNY

INTERRELATIONSHIP BETWEEN CYTOSINE METHYLATION AND CHROMATIN MODIFICATION

Karol STAWSKI, Grażyna DĄBROWSKA, Anna GOC

Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Zakład Genetyki,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Streszczenie: Genetyczne, biochemiczne i cytologiczne studia na temat metylacji cytozyny w DNA u organizmów eukariotycznych skłaniają do powiązania tego procesu z metylacją histonów, interferencją RNA (RNAi) i modelowaniem struktury chromatyny. Jest również oczywiste, że nie ma pojedynczej drogi objaśniającej powstawanie wszystkich znanych typów metylacji DNA u Eukaryota. W tym artykule zebrano wiedzę na temat kilku powszechnych mechanizmów odpowiedzialnych za kontrolę metylacji DNA.

Słowa kluczowe: metylacja cytozyny, wyciszenie genów, modyfikacje struktury chromatyny.

Summary: Genetic, biochemical and cytological studies on cytosine methylation in eukaryotic organisms indicate intriguing links between DNA methylation, histone methylation, RNA interference and chromatin remodeling. It is clear that no single pathway accounts for all DNA methylations found in Eukaryota. In this article several general mechanisms which control methylation are briefly described.

Key words: cytosine methylation, gene silencing, chromatin modification.

1. WSTĘP

Ekspresja genów u organizmów eukariotycznych zależy w głównej mierze od dostępności DNA dla czynników transkrypcyjnych. Większość genów w skondensowanej chromatynie jest nieaktywna. Za dwa główne mechanizmy odpowiadające za kontrolę ekspresji genów poprzez modulowanie struktury chromatyny uważa się metylację DNA i modyfikacje histonów. Epigenetyczne zmiany ekspresji genu odbywają się bez zmiany sekwencji DNA, a mogą być wywołane na skutek kowalencyjnego dodania grupy metylowej do cytozyny w DNA [1, 19].

Z końcem lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku metylacja DNA została rozpoznana jako ważny element epigenetyczny, który pozytywnie koreluje z transkrypcyjnym wyciszeniem genów. Większość 5-metylocytozyn w DNA u ssaków występuje w transpozonach, wewnątrzgenomowych pasożytach, które reprezentują co najmniej 30% genomu ssaków. Biologiczne znaczenie inaktywacji transpozonów nie jest dokładnie znane. Przypuszcza się, że jest to mechanizm obronny przeciwko zniszczeniom, jakie mogłyby wywołać ruchome elementy genomu w przypadku swobodnej transpozycji [73]. Wskutek przemieszczania się transpozonów mogą powstawać bardzo duże zmiany w strukturze genomów, takie jak: delecje, inwersje i duplikacje obejmujące nieraz bardzo obszerne rejony i powodujące niekiedy utratę funkcji jednych genów, a wzmożoną ekspresję innych. Ponadto metylacja odgrywa kluczową rolę w inaktywacji chromosomu X w żeńskich tkankach somatycznych i piętnowaniu rodzicielskim, które decyduje o prawidłowym rozwoju zarodka [8, 49]. Piętnowanie genów powoduje monoalleliczną ekspresję genów w zależności od pochodzenia od jednego z rodziców. Niektóre geny są preferencyjnie piętnowane podczas spermatogenezy, a inne podczas oogenezy. Za jeden z ważniejszych mechanizmów odpowiedzialnych za piętnowanie genomowe uważa się metylację DNA, jednak nie można wykluczyć innych czynników epigenetycznych decydujących o modyfikacjach genomu odmiennych niż zmiana sekwencji nukleotydowej. Z uwagi na to, że metylacji DNA przypisywana jest rola w regulacji ekspresji genów, jej nieprawidłowy poziom w genach, które kodują białka uczestniczące w kontroli regulacji cyklu komórkowego, może zaburzać homeostazę komórki prowadząc między innymi do transformacji nowotworowej [5]. W komórkach nowotworowych spada ogólny poziom metylacji DNA [13], a jednocześnie dochodzi do metylacji pojedynczych wysp CpG [69].

Wykazano, że gen może ulec unieczynnieniu nie tylko poprzez delecję lub mutację punktową, ale również poprzez metylację promotora. Istnieją liczne dowody na to, że metylacja i ekspresja genów są procesami powiązаныmi ze sobą przez wiele elementów. Można wśród nich wymienić skład nukleotydowy DNA, aktywność metylotransferaz, czynniki transkrypcyjne (aktywatory i represory), nukleosomy, histony, acetylazy i deacetylazy histonów, czynniki remodulujące strukturę chromatyny, białka wiążące zmetylowany DNA i wiele innych [1, 19, 58, 65].

2. METYLACJA, METYLOCYTOZYNA, DINUKLEOTYDY CpG

Metylacja cytozyny jest konserwatywną modyfikacją DNA wśród kręgowców, roślin i niektórych grzybów katalizowaną przez metylotransferazy, które przenoszą grupy metylowe z S-adenozylometioniny na piąty atom węgla cytozyny. U zwierząt metylowanie cytozyny następuje w układzie CpG, zaś u roślin również w innych sekwencjach, takich jak symetryczna CNG lub niesymetryczna CNN (gdzie N=A, T, C lub G) [16, 43, 44]. U kręgowców niezmetylowana frakcja DNA stanowi jedynie 1–2% genomu. Są to sekwencje charakteryzujące się wysoką zawartością G+C (powyżej 60%) i długością od 0,2 do 2 kbp tworzące tzw. wyspy CpG. Pozostałe dinukleotydy CpG, na

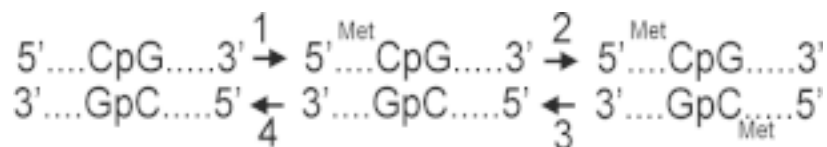
zewnątrz wysp CpG są przeważnie metylowane. W genomie kręgowców występuje niezwykle mało dinukleotydów CpG w porównaniu z oczekiwaną średnią frekwencją par CpG. Stanowi ona około 20% wartości wyliczonej na podstawie składu nukleotydów C i G. Powszechnie uważa się, że niski stopień CpG w genomie kręgowców wynika ze skłonności metylocytozyny do deaminacji [1, 26, 69]. Deaminacja 5-metylo-cytozyny prowadzi do powstania tyminy i niesparowanych zasad T/G. Jeśli mutacja nie zostanie naprawiona, w czasie replikacji w nowej nici DNA zamiast guaniny zostanie wbudowana adenina. Proces spontanicznej deaminacji cytozyny zaburza równowagę spontanicznych tranzycji zasad ($C \leftrightarrow T$; $G \leftrightarrow A$) i w efekcie w ssaczym DNA występuje znacznie więcej dwójek TpA i CpA niż CpG [26, 43].

Wyspy CpG są funkcjonalnie połączone ze strukturą genów. Ich występowanie w genomie pokrywa się lub sąsiaduje z końcami 5' wszystkich genów metabolizmu podstawowego i wielu genów regulowanych tkankowo lub rozwojowo. Wyspy CpG mogą występować co kilkadziesiąt tysięcy, a nawet co kilka milionów par zasad. Lokalizację wysp CpG można określić na podstawie analizy niemetylowanych miejsc restrykcyjnych zawierających dinukleotydy CpG, np. za pomocą enzymów *NotI*, *SacI* [1, 58].

3. ZMIANY POZIOMU METYLACJI DNA

Wzór metylacji DNA jest ustanawiany przez dwa przeciwstawne procesy: metylację i demetylację genomu (ryc. 1). Pierwszy z nich jest enzymatyczny, a drugi polega bądź na biernym braku metylacji nici DNA powstałej w wyniku replikacji, bądź jest wynikiem niezależnych od replikacji DNA mechanizmów naprawy DNA.

Istnieją dwie kategorie metylotransferaz DNA: o aktywności *de novo* lub o aktywności zachowującej metylację w czasie kolejnych podziałów komórkowych. Ten podział nie wydaje się jednak być bezwzględny, gdyż obie grupy enzymów zachodzą na siebie funkcjonalnie. Sposób wyznaczania miejsc metylacji *de novo* nie jest dobrze poznany, ale wiadomo, że w grę wchodzi kilka potencjalnych dróg metylacji cytozyny [19, 58]. Przypuszcza się, że metylacja cytozyny w określonych sekwencjach jest zależna od składu zasad azotowych lub też od drugorzędowej struktury chromatyny. U roślin za ten proces mogą również odpowiadać cząsteczki RNA wykazujące homologię do DNA. Metylacja nierozzerwalnie wiąże się ze strukturą chromatyny, dlatego badania mechanizmów metylacji *de novo* skupiają się głównie na poznaniu czynników modyfikujących strukturę chromatyny [19, 58].



RYCINA 1. Metylacja dinukleotydu CpG. Na schemacie pokazano zależności między możliwymi poziomami metylacji CpG. 1 – metylacja *de novo*, 2 – metylacja zachowawcza (hemimetylacja), 3 i 4 – demetylacja (wg [64] – zmodyfikowany)

Metylacja *de novo* u ssaków zachodzi podczas embriogenezy, po uprzednim procesie demetylacji prawie całego genomu, który ma miejsce podczas pierwszych podziałów zapłodnionej komórki jajowej [49]. Dodatkowa metylacja *de novo* może zachodzić również później w czasie rozwoju organizmu, nawet w wyspecjalizowanych komórkach, w celu wyciszenia nabytych sekwencji prowirusowych lub w celu realizacji programu specjalizacji komórkowej. W rozwijającym się płodzie i po urodzeniu metylacja jest zjawiskiem charakterystycznym dla określonych typów komórek i tkankowo specyficznym. Zaburzenie prawidłowego wzorca metylacji może prowadzić do hipermetylacji regionów promotorowych supresorów nowotworowych. Jest to ważny mechanizm w przypadku nowotworzenia [5]. U *Arabidopsis thaliana* spadek zawartości 5-metylocytozyny powoduje głębokie zmiany w rozwoju roślin i morfologii kwiatów [44].

3.1. Mechanizm metylacji DNA u ssaków

Proces metylacji DNA ssaków opiera się na czterech niezależnie kodowanych metylotransferazach DNA: Dnmt1, Dnmt2, Dnmt3a i Dnmt3b. Dnmt1 jest najlepiej poznaną hemimetylaza, która metyluje cytozynę w parze CpG z dużą wydajnością wtedy, gdy komplementarna sekwencja z drugiej nici jest już zmetylowana [1, 22, 72]. Jeśli oba układy dinukleotydu CpG są niezmetylowane, wydajność enzymu zmniejsza się 10- lub nawet 30-krotnie [72]. Enzym ten jest zatem odpowiedzialny za utrzymanie metylacji DNA w czasie kolejnych rund replikacji poprzedzających podziały komórkowe. Inaktywacja genu *Dnmt1* w komórkach zarodkowych, metodą homologicznej wymiany genów, prowadzi do niekontrolowanej demetylacji genomu. Zarodki homozygotyczne pod względem nieaktywnych alleli *Dnmt1* na początku dzielą się prawidłowo, jednak podczas gastrulacji dochodzi do wielu nieprawidłowości rozwojowych i w konsekwencji do śmierci płodów [35].

Inaktywacja obu alleli genu *Dnmt1* w mysich pierwotnych komórkach zarodkowych nie prowadzi jednak do całkowitego zahamowania metylacji DNA. Istnieje jeszcze jedna grupa metylotransferaz DNA metylująca cytozynę w dinukleotydach CpG o aktywności *de novo* [35]. Potwierdziło to odkrycie enzymów Dnmt3a i Dnmt3b, które nie wykazywały preferencji substratowej wobec hemimetylowanego DNA. Oba uczestniczą w metylacji *de novo* podczas bardzo wczesnych stadiów rozwojowych zarodka [22].

Dnmt3a i Dnmt1 kooperują wzajemnie w procesie metylacji DNA, ponieważ obecność obu enzymów jednocześnie podnosi pięciokrotnie szybkość metylacji. Aktywność Dnmt3a stymuluje metylację prowadzoną przez Dnmt1. Dnmt1 poprzez interakcję z Dnmt3a prawdopodobnie wpływa na przebieg procesu metylacji *de novo* [15].

Gen *Dnmt2* zidentyfikowano u wielu Eukaryota, lecz *in vitro* wykazuje on znikomą lub całkowity brak aktywności metylotransferazy DNA [22, 42]. Delecja genu *Dnmt2* analizowana w mysich pierwotnych komórkach zarodkowych nie wpływa w widoczny sposób na metylację DNA, mimo że gen ten zawiera wszystkie katalityczne domeny charakterystyczne dla DNMT [35]. Przeciwnie u *Drosophila*: gen *Dnmt2* okazał się być istotny dla metylacji genomu w komórkach embrionalnych. Konsekwentnie

nadekspresja genu *Dnmt2* u muszki prowadzi do hipermetylacji genomu w dinukleotydach CpT i CpA [22, 42].

Gen *Dnmt3L* u ssaków wykazuje wysoką homologię do *Dnmt3*, lecz tak jak w przypadku *Dnmt2*, jego aktywność jest rozwojowo specyficzna. *Dnmt3L* ulega ekspresji jedynie podczas gametogenezy, w okresie, w którym jest ustanawiane rodzicielskie piętno genomowe. Mutacja *Dnmt3L* skutkuje utratą metylacji genów podlegających matczynemu piętnowaniu, co przejawia się ich nieprawidłową ekspresją. *Dnmt3L* wpływa także na metylację *de novo* rozproszonych sekwencji repetytywnych w premeiotycznych męskich komórkach rozrodczych [9, 10]. Biochemiczne dowody wskazują, że udział *Dnmt3L* w metylacji odbywa się za pośrednictwem metylotransferaz o aktywności *de novo*: *Dnmt3a* i *Dnmt3b* [10].

3.2. Metylacja cytozyny u grzybów

Dogodnym organizmem modelowym służącym do badań zjawisk metylacji jest *Neurospora crassa*, gatunek, który ma pojedynczą metylotransferazę DIM-2 odpowiedzialną za wszelkie możliwe typy metylacji genomu *Neurospora*. Dodatkowo mutacja genu *dim-2* nie wywiera wyraźnego wpływu na fenotyp, mimo obszernej demetylacji genomu [33].

Większość genomu *Neurospora* jest pozbawiona metylacji, przyjmuje się, że ok. 1,5% wszystkich cytozyn ma dołączoną grupę metylową. Metylacja genomu dotyczy rybosomalnego DNA oraz sekwencji zmienionych na skutek punktowych mutacji RIP (ang. *repeat-induced point mutation*). Mutacje RIP są ograniczone do sekwencji repetytywnych genomu i zachodzą tylko podczas rozmnażania płciowego, gdzie dochodzi do połączenia strzępek grzybni przeciwstawnych typów koniugacyjnych, początkowo bez kariogamii. Haploidalne jądra ustawiają się parami i pozostają w takim układzie aż do kariogamii, po której następuje mejoza. Mutacje punktowe RIP zachodzą w haploidalnych jądrach w okresie pomiędzy plazmogamią a kariogamią [56].

Mechanizm RIP prowadzi do wybiórczej konwersji CpA w TpA, generując powstawanie sekwencji bogatych w T+A [56]. Jedną z hipotetycznych dróg mutacji RIP zakłada miejscowo specyficzną *de novo* metylację cytozyny, a następnie jej enzymatyczną deaminację przy 4. węglu, co prowadzi do powstania T. Drugą z hipotez przyjmuje bezpośrednią deaminację cytozyny do uracylu. Jednym z pierwszych poznanych elementów maszynarii RIP jest RID (ang. *RIP defective*) prawdopodobnie czynnik o aktywności metylazy DNA lub aktywności deaminującej cytozynę [20].

Sekwencje bogate w A+T wygenerowane na skutek mutacji RIP w większości przypadków stanowią sygnał dla metylacji pozostałych cytozyn w obrębie rejonu A+T-bogatego i sekwencji flankujących. Zmiany wywołane przez RIP w składzie nukleotydowym sekwencji zmetylowanych nie są jednak rozległe i dotyczą zaledwie kilku procent nukleotydów. Próbując wyjaśnić mechanizm metylacji *de novo* u *Neurospora*, podjęto analizę sekwencji zmutowanych wskutek działania RIP [56]. Sekwencje z umiarkowaną zawartością TpA i ApT indukują silniej metylację od sekwencji z maksymalną ich zawartością, np. sekwencja o składzie (TAAA)_n powtórzona 25 razy wywołuje pięciokrotnie większą metylację od sekwencji o tej samej długości zbudowanej z

monomerów (TATA)_n. Sekwencja (TAAA)_n powtórzona 75 razy jest już wystarczającej długości, by wywołać silną metylację w dowolnym miejscu genomu, nawet jeśli sekwencje flankujące nie wykazują charakterystycznych zmian powstałych na skutek mutacji RIP. Badania *in vitro* ujawniły, że spośród 16 testowanych kombinacji najbardziej stymulująco na metylację *de novo* działają zestawienia sekwencji w układzie (TAAA)_n i (TTAA)_n. Siła metylacji zależy do ilości powtórzeń sekwencji bogatej w A+T. Nawet słaby sygnał, ale zwielokrotniony odpowiednią ilością razy, może wywoływać silną metylację [56]. Wprowadzenie zasad G:C w którąkolwiek pozycję w wielokrotnie powtórzonej sekwencji (TAAA)_n hamuje metylację. Efekt jest jednak różny i zależy od pozycji. Inhibicja metylacji jest szczególnie silna np. w układzie CpApT [56].

3.3. Mechanizm metylacji cytozyny u roślin

Genom *Arabidopsis thaliana* zawiera co najmniej 10 genów kodujących metylotransferazy, które podzielono pomiędzy 3 rodziny, kolejno są to: MET1, CMT i DRM. Jest to do tej pory najliczniejsza grupa metylotransferaz znalezionych u pojedynczego organizmu [16, 64]. Kryterium, jakie posłużyło do pogrupowania genów na rodziny, stanowi homologia roślinnych metylotransferaz DNA z sekwencjami ssaków. Szczegółowo badana roślinna klasa metylotransferaz MET1 jest wysoce homologiczna z Dnmt1 ssaków, odpowiedzialną za metylację zachowawczą w czasie podziałów komórek. Potranskrypcyjne wyciszenie genu *MET1* poprzez degradację transkryptu genu przyczynia się do ogólnego spadku poziomu metylacji DNA o ok. 10% [17]. Większa redukcja, aż o około 50%, dotyczyła mutantów genu *Met1* (*met1-1* i *met1-2*) [32]. Wynikająca stąd funkcja genu polega na utrzymywaniu stałego poziomu metylacji genomu. Demetylacji, na skutek zahamowania aktywności MET1, w pierwszej kolejności ulegają sekwencje repetytywne, co przejawia się zaburzeniami morfogenezy i procesu kwitnienia [32, 53]. Badania te potwierdzają znaczącą rolę metylacji w regulacji ekspresji genów. Homozygotyczne zarodki z dwoma nieaktywnymi allelami genu *Met1*, uzyskane metodą homologicznej wymiany genów, są letalne na skutek całkowitej utraty metylacji w CpG i umiarkowanej w pozostałych sekwencjach [53].

Klasa roślinnych DRM (ang. *domain rearranged methyltransferase*), analogiczna do metylotransferazy Dnmt3 ssaków, prowadzi metylację *de novo* na obu niciach DNA. Koniec N-terminalny tych metylotransferaz zawiera szereg domen ubikwitynowych, które mogą brać udział w interakcjach białko-białko [11, 64].

Metylasy charakterystyczne wyłącznie dla roślin to chromometylasy (CMT – ang. *chromomethylase*) zaangażowane w metylację zachowawczą. Cechą, która je wyróżnia, jest specyficzna chromodomena zlokalizowana wewnątrz konserwatywnej katalitycznej domeny metylotransferaz DNA. CMT3 prowadzi metylację w sekwencjach innych niż CpG, a w szczególności w sekwencji CpNpG. W przeciwieństwie do mutantów genu *Met1*, mutanty genu *CMT3* lub *DRM* nie wytwarzają nieprawidłowych fenotypów, chociaż w niektórych przypadkach potwierdzono wznowienie aktywności genów wcześniej wyciszonych [4, 37].

4. METYLACJA DNA, INTERFERENCJA RNA I TRANSKRYPCYJNE WYCISZENIE GENÓW

Potranskrypcyjne wyciszenie genów (PTGS, ang. *post-transcriptional gene silencing*) jest mechanizmem redukującym poziom cytoplazmatycznego RNA, który pierwotnie został odkryty u roślin. Podobny mechanizm został zidentyfikowany u zwierząt, gdzie jest określany jako interferencja RNA (RNAi) [2]. Drugą formą wyciszania genów u roślin jest metylacja DNA za pośrednictwem RNA, którą określa się jako RdDM (ang. *RNA-directed DNA methylation*). Jest to jeden z lepiej poznanych sposobów wyznaczania miejsc metylacji DNA. Interakcje pomiędzy RNA-DNA są sygnałem do podjęcia metylacji, która decyduje o aktywności transkrypcyjnej genu. RdDM łączy się ściśle z PTGS/RNAi. O specyfice obu procesów decyduje RNA o strukturze 2-niciowej (dsRNA, ang. *double strand RNA*), który jest cięty przez RNazy klasy III na fragmenty o długości 21–26 nukleotydów [2]. W ten sposób powstają cząsteczki siRNA (ang. *small interfering RNA*) i miRNA (ang. *micro RNA*). U zwierząt miRNA i siRNA powstają w wyniku aktywności enzymatycznej tej samej RNazy III noszącej nazwę Dicer, a u roślin grupy enzymów określanych jako DCL (ang. *Dicer like*) [24].

W trakcie PTGS antysensowny siRNA po rozpleceniu do pojedynczych łańcuchów wchodzi w skład kompleksu RISC (ang. *RNA induced silencing complex*), odpowiedzialnego za degradację komplementarnego mRNA. W procesie tym wydajnie uczestniczą liczne białka rodziny ARGONAUTE (AGO), które prawdopodobnie ułatwiają wiązanie się siRNA do sekwencji docelowej RNA [12]. Endonukleolityczne cięcie mRNA w połowie rejonu komplementarnego do siRNA zapoczątkowuje degradację całego transkryptu [6, 24].

Trudno jednoznacznie ustalić, czy RdDM jest kierowana przez długie dsRNA czy siRNA. Minimalna długość sekwencji DNA podlegającej zależnej od RNA metylacji to zaledwie 30 pz, co rodzi przypuszczenia, że efektorowy RNA powstaje w wyniku enzymatycznego cięcia dsRNA [39]. RdDM wywołuje wysoki poziom metylacji większości sekwencji DNA, niezależnie od kontekstu występowania cytozyny, w obszarze, który wykazuje homologię pomiędzy dsRNA i sekwencją DNA. RdDM wymaga udziału roślinnych metylotransferaz o aktywności *de novo*: DRM i/lub CMT [45].

RdDM po raz pierwszy zaobserwowano u transgenicznym roślin tytoniu infekowanych wiroidem. Rośliny te miały wielokrotne kopie cDNA wiroidu zintegrowane z genomem [66]. Metylacja DNA ograniczona była wyłącznie do obszarów cDNA wiroidu i zachodziła równolegle z autonomiczną replikacją wiroidu [45, 66]. Wynik ten, jak i kolejne badania dotyczące kilku różnych wirusów roślinnych potwierdziły, że podczas infekcji komórek dochodzi do metylacji DNA w obszarze zgodnym z RNA wirusa [30, 65]. Ponieważ wiroidy i wirusy podczas swego cyklu litycznego wytwarzały tylko RNA, testy te bezspornie udowodniły, że RNA może bezpośrednio kierować metylacją komplementarnej sekwencji DNA.

Mechanizm RdDM może być nie tylko wywoływany przez infekcje wirusowe, ale również przez transgenizację roślin. Bardzo często ekspresja transgenu jest niższa od oczekiwanej, do czego przyczynia się między innymi inaktywacja genu na skutek

metylacji jego sekwencji. Potwierdzono to eksperymentalnie na transgenicznym roślina *A. thaliana* z dodatkowym odwróconym fragmentem sekwencji genu β -glukuronidazy (*GUS*), który ulegał ekspresji równolegle z endogennym *GUS*. Sensowne i antysensowne transkrypty łączyły się ze sobą tworząc strukturę 2-niciową. W transgenicznej roślinie spadła znacząco ilość *GUS*, a sekwencja genu ulegała metylacji [7].

Metylacja DNA ustanowiona w drodze RdDM nie jest stała i zależy od długości sekwencji DNA i otoczenia, w jakim występuje cytozyna. Zanik sygnałów dla RdDM prowadzi do obniżenia poziomu metylacji większości dinukleotydów CpG [31] lub do całkowitej utraty metylacji [37]. W przypadku wielu transgenów zdolnych do wywołania RNAi i metylacji DNA nie dochodzi do wyciszenia transkrypcji wprowadzonego genu. Metylacja zazwyczaj dotyczy wyłącznie sekwencji kodującej genu i nie rozprzestrzenia się na sekwencję promotora, który zachowuje aktywność transkrypcyjną [14].

Funkcjonalne znaczenie RdDM może wydawać się mało przejrzyste, jednak w przypadku metylacji sekwencji promotora dochodzi do transkrypcyjnego wyciszenia genów. Jako przykład można podać wyciszenie ekspresji genu *GFP* (ang. *Green Fluorescent Protein*) znajdującego się pod kontrolą sekwencji promotora 35S w transgenicznej roślinie tytoniu. Infekcja takiej rośliny modyfikowanym wirusowym RNA niosącym sekwencje *GFP* pod promotorem 35S hamuje radykalnie ilości wytwarzanego białka *GFP* na skutek metylacji sekwencji promotora i wyłączenia aktywności transgeny. W tym układzie transkrypt *GFP*, jak i wirusowy RNA były degradowane [30, 60]. Nie wszystkie sekwencje DNA są jednakowo podatne na RdDM. W pewnych szczególnych przypadkach infekcja roślin tytoniu wirusowym RNA niosącym kopie genów gospodarza wywołuje wyłącznie PTGS bez metylacji sekwencji DNA [30]. Może to odzwierciedlać wyjątkowe cechy niektórych endogennych genów, które są chronione przed RdDM lub znacząco opóźniają ten proces w czasie infekcji wirusowej.

4.1. Drogi generowania sygnałów dsRNA odpowiadających za metylację DNA

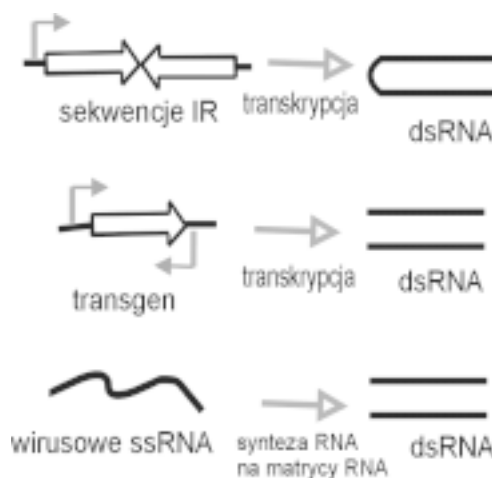
Warunkiem zajścia metylacji drogą RdDM jest powstanie w komórce struktur dsRNA. U roślin dsRNA powstaje między innymi na skutek infekcji wirusowych cząsteczek RNA lub przez wprowadzenie transgenów zawierających sekwencje powtórzone o przeciwnej orientacji IR (ang. *inverted repeats*). Sekwencje IR mają samoistną zdolność do wytwarzania struktury dsRNA typu spinki do włosów, która jest rozpoznawana przez rybonukleazy Dicer generujące powstawanie siRNA [40]. Brak sekwencji IR w transgenie nie wyklucza jednak możliwości występowania w komórce jego formy dwuniciowej. Pojedyncze nici RNA (ssRNA, ang. *single strand RNA*) transgeny mogą służyć jako matryca podczas syntezy nici antyrównoległych (ryc. 2). Enzymy, które katalizują ten proces, należą do klasy polimeraz RNA zależnych od RNA (RdRP, ang. *RNA-dependent RNA polymerase*) [41, 57]. siRNA hybrydując do transkryptu zwiększa ilość powstających cząsteczek dsRNA bezpośrednio – służąc jako starter dla RdRP lub pośrednio – zwiększając dostępność transkryptu dla polimerazy RdRP. siRNA pierwotnie komplementarne wyłącznie do końca 5' docelowego transkryptu często rozprzestrzenia się na całą długość docelowego transkryptu i w takim wypadku metylacji DNA podlega cała sekwencja transgeny [30, 60]. Możliwe, że antysensowny siRNA oddziałuje ze swoim transkrypcyjnym powstaniem

dsRNA, co może zmieniać strukturę RNA i/lub kompleksu rybonukleoprotein rekrutując RdRP do końca 3'. Druga z możliwości zakłada, że kompleks dsRNP/siRNP wpływa bezpośrednio na DNA i jego strukturę.

Poszukując czynników odpowiedzialnych za biogenezę dsRNA u *Arabidopsis* wyizolowano 6 potencjalnych RdRP [41] oraz 10 białek typu ARGONAUTE i 4 białka należące do rodziny roślinnych nukleaz pochodnych enzymu Dicer (DCL) [40]. Spośród 6 RdRP tylko 3 (RDR1, RDR2 i RDR6) wykazują aktywność. Dokładna analiza czynników biorących udział w obróbce dsRNA wskazuje na ich działanie w kilku równoległych przebiegających procesach, czasami

zachodzących na siebie funkcjonalnie, co zależy prawdopodobnie od lokalizacji i struktury RNA. Przykładowo RDR6 i białko AGO1 są czynnikami koniecznymi w przypadku PTGS transgenów pozbawionych sekwencji IR, które nie tworzą samoistnie struktur dsRNA [7, 41], a jednocześnie bardzo podobne funkcje spełnia RDR2 i AGO4, które są wymagane do nagromadzenia siRNA dla określonych endogennych sekwencji [50]. Odpowiednio, każdy z wymienionych czynników jest konieczny do podtrzymywania metylacji DNA sekwencji innych niż CpG, które mają swój odpowiednik w sekwencji RNA. Wyjaśnia to częściowo związek między dsRNA i RdDM.

Roślinne DCL kontrolują różnorodne procesy. DCL1 *Arabidopsis thaliana* jest niezbędny do obróbki miRNA, które w odróżnieniu od siRNA są jednoniciowe. DCL2 uczestniczy w obronie antywirusowej rośliny. Utrata aktywności genu *dcl2* wiąże się z obniżonym poziomem wirusowych siRNA, a także podwyższoną wrażliwością na infekcje wirusowe, co zaobserwowano u roślin infekowanych TVC (ang. *turnip crinkle virus*). DCL3 i RDR2 generują powstawanie endogennego siRNA przeważnie o wielkości ok. 24 pz. Utrata endogennego siRNA u podwójnych mutantów *dcl3* i *rdr2* *A. thaliana* była zasocjowana z utratą metylacji heterochromatyny i zwiększoną transkrypcją określonych loci [68]. DCL3 i RDR2 są konieczne dla ustanowienia i podtrzymania wzoru metylacji sekwencji DNA wyznaczonych w procesie RdDM [68]. Mutacje znanych genów *DCL* nie wpływają na PTGS transgenów ani na metylacyjne wyciszanie promotorów, co wskazuje na obfite powstawanie siRNA przy udziale dodatkowych DCL lub też w określonych przypadkach RdDM jest wywoływany przez dłuższe dsRNA [40].



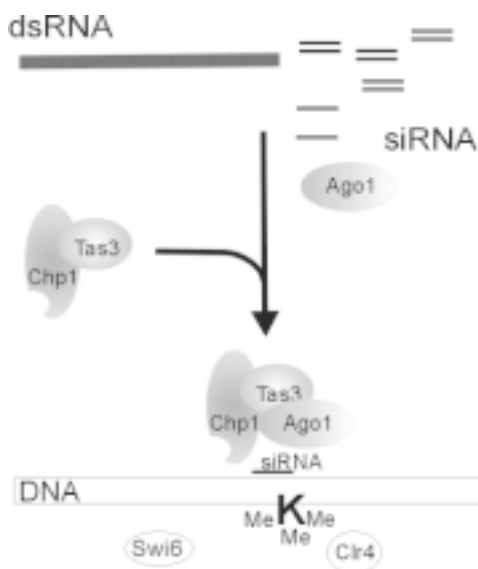
RYCINA 2. Mechanizm powstawania dsRNA (wg [40] – zmodyfikowany)

5. KONDENSACJA HETEROCHROMATYNY PRZY UDZIALE siRNA

Heterochromatyna stabilizuje strukturę chromosomów, wpływa na regulację ekspresji genów i koniugację chromosomów oraz rekombinację genów, poprzez oddziaływanie na częstość i umiejscowienie chiazm. Wyróżnia się heterochromatynę konstytutywną, która zazwyczaj nigdy nie podlega transkrypcji, jest zdeterminowana molekularnie dzięki obecności satelitarnego DNA, reprezentuje regiony genomu, które są permanentnie w stanie wysokiego skondensowania. Przeciwnie heterochromatyna fakultatywna zawiera geny, które uległy represji i w określonych warunkach mogą być transkrybowane. Heterochromatyna jest zdeterminowana dzięki wysokiemu stopniowi metylacji histonu H3 w miejscu lizyny 9 (H3K9) i umiarkowanemu poziomowi metylacji lizyny 4 (K4). Metylacja H3K9 stanowi sygnał dla wiązania się czynnika HP1, który jest białkiem charakterystycznym dla heterochromatyny [3].

Wyjątkowość konstytutywnej heterochromatyny centromerowej polega na zamianie histonu H3 na białko: CENP-A (*H. sapiens*), Cid (*Drosophila*), HTR12 (*Arabidopsis*), HCP-4 (*C. elegans*) i Cse4p (*S. pombe*). Wszystkie te białka są zaliczane do rodziny CenH3 (ang. *centromere-specific H3-like*) [62]. Są one niezbędne dla zasadniczych funkcji centromeru, segregacji chromosomów w czasie podziałów komórkowych, gdyż stanowią one jeden z głównych elementów wewnętrznej, granularnej warstwy kinetochoru przylegającej do chromatyny [59].

Za kondensację chromatyny w rejonie centromeru u *Schizosaccharomyces pombe*



RYCINA 3. Schemat kontrolowanej przez siRNA metylacji lizyny 9 histonu H3 prowadzącej do kondensacji chromatyny (wg [48] – zmodyfikowany)

odpowiada siRNA. Mechanizm jego powstawania jest taki sam jak w przypadku interferencji RNA. U *S. pombe* i *Arabidopsis* występuje duża pula endogennego siRNA komplementarna do repetytywnych sekwencji centromerowych, transpozonów i innych retroelementów [38, 50]. Czynniki powiązane z interferencją RNA, takie jak: Dicer, RdRP i AGO, są konieczne dla podtrzymania centromerowych sekwencji satelitarnych w stanie wysokiej kondensacji heterochromatyny, co zostało udowodnione w przypadku chromosomów *S. pombe*. Mutanty, które utraciły niektóre z elementów maszyny odpowiedzialnej za PTGS, tracą metylację histonów H3 w pozycji K9, która jest uważana za modyfikację specyficzną dla heterochromatyny [23]. Podobny efekt wywołują mutacje w genach kodujących Swi6 (ssaczy homolog HP1) i Clr4 (homolog ssaczej metylotrans-

ferazy histonowej Suv39) metylującej lizynę K9 histonu H3 [62]. Formowanie heterochromatyny przy udziale siRNA nie jest jednak uniwersalne dla wszystkich organizmów. *Neurospora* dla wytworzenia i podtrzymywania wysokiej kondensacji heterochromatyny nie wymaga kluczowych elementów odpowiedzialnych za proces interferencji RNA [18].

Niskocząsteczkowe siRNA inicjuje kondensację chromatyny poprzez kompleks RITS (ang. *RNA-induced transcriptional silencing complex*), który zapoczątkowuje modyfikacje struktury chromatyny i wyłączenie aktywności obszarów przeznaczonych do kondensacji w komórkach *Schizosaccharomyces*. W skład kompleksu RITS wchodzi: Ago1 – białko z rodziny ARGONAUTE zaangażowane w proces RNAi, a także białko Chp1 (ang. *heterochromatin-associated chromodomain protein 1*) i Tas3 (ang. *targeting complex subunit 3*). Powstanie puli endogennego siRNA komplementarnego do sekwencji centromerowych wymaga wcześniejszego wytworzenia struktur dsRNA, co zapewnia transkrypcja obszarów repetytywnych centromeru z dwóch opozycyjnie zorientowanych promotorów [63]. Ponieważ centromer *S. pombe* jest regionem o znacznej wielkości od 40 do 100 kb, zbudowanym z powtarzalnych sekwencji, trudno jednoznacznie określić, czy powstający siRNA jest wynikiem aktywności domeny pojedynczego centromeru, czy może różnych centromerów [50]. Przypuszcza się również, że do produkcji dodatkowych kopii dsRNA wykorzystywana jest klasa polimeraz RdRP prowadząca transkrypcję na matrycy ssRNA [29, 61]. Potencjalne miejsca kondensacji chromatyny wyznacza siRNA poprzez swoją homologię do sekwencji docelowej, którą może być zarówno DNA, jak i powstający transkrypt siRNA, działając jako wysoko selektywny czynnik. Prawdopodobnie siRNA i DNA lub siRNA i jego powstający transkrypt wchodzi we wzajemne interakcje za pośrednictwem białka Ago1, co prowadzi do naboru pozostałych elementów kompleksu RITS: Chp1 i Tas3 (ryc. 3). Proces heterochromatynizacji, w przylegającym rejonie chromatyny wyznaczonym przez RITS, rozpoczyna się od przyłączenia metylotransferazy Clr4, która metyluje histon H3 w miejscu lizyny 9, co wywołuje przyłączenie się Swi6 i całą kaskadę zdarzeń prowadzącą do kondensacji obszaru centromeru (tab. 1). Czynniki Chp1 i Tas3 mogą być również lokalizowane w heterochromatynie poza obszarami centromeru, niezależnie od Ago1 i siRNA [48].

TABELA 1. Występowanie elementów wybranych mechanizmów wywołujących wyciszenie transkrypcji u różnych gatunków

Organizm	Metylotransferaza K9 histonu H3	HP1	Metylowana cytozyna	Autorzy
<i>S. pombe</i>	Clr4	Swi6	nie	[48, 61, 63]
<i>N. crassa</i>	DIM-5	?	tak	[18, 55]
<i>M. musculus</i>	Suv39h1, Suv39h2	MHP1a, M31/MOD1, M32/MOD2	tak	[34, 52]
<i>H. sapiens</i>	SUV39H1	HP1	tak	[34, 52]
<i>A. thaliana</i>	KRYPTONITE	LHP1	tak	[27]

6. ZWIĄZEK MIĘDZY METYLACJĄ DNA A STRUKTURĄ CHROMATYNY

Uważa się, że metylacja DNA może być wywoływana przez zmienną strukturę chromatyny [8]. Histony rdzeniowe są podatne na szeroki wachlarz potranslacyjnych modyfikacji obejmujących: acetylację, fosforylację, metylację, ubikwitynację, glikozylację i ADP-rybozylację. Modyfikacje dotyczą zwłaszcza N-końców histonów dostępnych dla interakcji z innymi histonami i niehistonowymi białkami chromosomowymi. Modyfikacje histonów są częścią złożonego systemu. Odmienne modyfikacje jednego lub więcej histonów albo kombinacje tych zmian tworzą rodzaj kodu histonowego, który decyduje o rodzaju nukleosomowych interakcji i o asocjacji niehistonowych białek chromatynowych. Wymienione modyfikacje bezpośrednio przekładają się na stopień kondensacji chromatyny i regulację aktywności genów [51, 52]. Wiele z tych modyfikacji może być także zależnych od siebie. Dla przykładu kombinacja acetylowanych histonów H4 przy lizynie 8, H3 przy lizynie 14 i fosforylacja seryny 10 histonu H3 jest często pozytywnie skorelowana z transkrypcją. Natomiast trimetylacja lizyny 9 histonu H3 i brak acetylacji histonów H3 i H4 wiążą się z represją transkrypcji, a taki rodzaj modyfikacji jest konieczny do kondensacji chromatyny u myszy. Zmianom struktury chromatyny związanym z pozycjonowaniem histonów w czasie replikacji DNA towarzyszy deacetylacja lizyny 4 i 12 histonu H4, a kondensacji chromosomów metafazowych – fosforylacja H2A i H3 [46, 47].

Aktywność transkrypcyjną chromatyny warunkują enzymy modyfikujące histony: acetylazy HAT, deacetylazy HDAC, metylotransferazy HMT, demetylazy, kinazy i fosfatazy histonowe. Metylacja histonów przy udziale HMT jest już znana od dawna. Na N-końcach histonów H3 i H4 istnieje co najmniej 5 miejsc metylacji lizyny. Typowy ssaczy histon H3 jest metylowany w miejscu lizyny K9 i K27, a histon H4 – w K20. Lizyna może posiadać dołączone trzy, dwie lub jedną grupę metylową. Sposób demetylacji histonów przez długi okres stanowił zagadkę, choć wiadomo było, że histony H2B, H3 i H4 podlegają odwracalnej metylacji [47].

Metylacja histonów jest termodynamicznie bardzo stabilną modyfikacją, dlatego tym ciekawsze wydaje się odkrycie enzymu usuwającego dołączone grupy metylowe [54]. Pierwsza odkryta demetylaza o nazwie LSD1 (ang. *lysine-specific demethylase 1*) usuwa grupy metylowe lizyny 4 w histonie H3. Reakcja jest katalizowana na mono- i dimetylowanej lizynie z wyłączeniem trimetylowanej lizyny. Enzym nie zrywa bezpośrednio wiązania N-CH₃, lecz prawdopodobnie indukuje oksydację lizyny 4 w histonie H3. W wyniku tej reakcji powstaje lizyna wolna od metylacji oraz formaldehyd. Właściwości demetylasy LSD1 wynikają z jej wysokiej homologii do aminooksydaz zależnych od FAD (przenośnika elektronów w reakcjach utleniania). Cechą, która wyróżnia LSD1, jest sygnał lokalizacji jądrowej (NLS) oraz domena SWIRM charakterystyczna dla białek chromatynowych. Wyciszenie genu *LSD1* prowadzi do wzrostu metylacji lizyny 4 H3, co ma bezpośrednie przełożenie na poziom transkrypcji [54].

Mutacje histonu H3 w miejscu K9, poprzez podstawienie lizyny innym aminokwasem, skutkowały utratą metylacji DNA u *N. crassa*, dostarczając pierwszego dowodu na to, że metylacja histonów jest powiązana z metylacją DNA. Metylacja histonów u *Neurospora* [55] i *Arabidopsis* [27], zwłaszcza metylacja histonu H3 w pozycji K9, wywołuje metylację cytozyny w DNA (tab.1). Nie wiadomo, czy podobny mechanizm działa u kręgowców. Z kolei metylacja DNA może wywoływać metylację histonów. U ssaków pośredniczy w tym białko MeCP2 wiążące metyloowane CpG, gromadzi ono w tych miejscach deacetylazy histonów, a po nich przyłączają się kolejno HMT [21]. Modyfikowane histony są rozpoznawane przez różne mechanizmy. Jednym z białek rozpoznających metylację H3K9 jest HP1 (ang. *heterochromatin-associated protein 1*) zawierające dwie wysoce konserwatywne domeny: CD (ang. *chromo domain*) i CSD (ang. *chromo shadow domain*) [36]. Domena CD wykazuje wysoką specyficzność wiązania do N-końca H3 posiadającego zmetylowaną lizynę K9 [28], a rolą CSD jest oddziaływanie z białkami niehistonowymi. Lokalizacja HP1 u ssaków jest uzależniona od obecności metyloowanej lizyny 9 w histonie H3 i wiele wskazuje na to, że HP1 organizuje strukturę heterochromatyny [3]. U myszy pericentromerowa chromatyna charakteryzuje się wysokim poziomem metylacji DNA i trimetylacją histonu H3 w pozycji K9 [45]. Za ustanowienie trimetylacji histonu H3 odpowiadają metylotransferazy Suv 39h1 i Suv 39h2 (tab. 1). Modyfikacja H3K9 przez HMT tworzy miejsca wiązania dla białka HP1, które z kolei oddziałuje z metylotransferazami DNA: Dnmt1 i/lub Dnmt3a/Dnmt3b prowadząc do metylacji DNA [34]. Nie można jednak wykluczyć istnienia innych potencjalnych dróg metylacji *de novo*.

7. METYLOWANE REGIONY DNA I ICH WZAJEMNE ZALEŻNOŚCI PODCZAS PIĘTNOWANIA RODZICIELSKIEGO

Geny podlegające piętnowaniu genomowemu są transkrybowane wyłącznie mono-allelicznie. Do tej grupy genów zalicza się *Igf2r*. Wykazuje on odmienne piętnowanie w zależności od pochodzenia od jednego z rodziców. W rejonach podlegających piętnowaniu rodzicielskiemu metylacji ulegają zróżnicowane sekwencje i w pewnych przypadkach bezdyskusyjnie one same stanowią sygnał dla metylacji. Gen *Igf2r* zawiera dwie wyspy CpG nazywane regionami 1 i 2. Gen niesie informacje o receptorze dla insulinopodobnego czynnika wzrostu IGF2 (ang. *insulin-like growth factor type 2*), odgrywającym istotną rolę w rozwoju płodu ssaków. Region 2 leży w obrębie intronu i jest zmetylowany w aktywnym matczynym chromosomie. Region 1, który otacza miejsce startu transkrypcji *Igf2r* jest zmetylowany w wyciszonym chromosomie ojcowskim. Po usunięciu z transgeny regionu 2, region 1 nie podlegał metylacji podczas dziedziczenia ojcowskiego i w rezultacie ojcowska wersja transgeny była aktywna. Można więc sądzić, że niezmetylowany region 2 jest niezbędny do metylacji regionu 1 i wyciszenia aktywności genu, natomiast piętnowany matczynie region 2 lub jego delekcja blokują lub powodują niezdolność do metylacji regionu 1 [67].

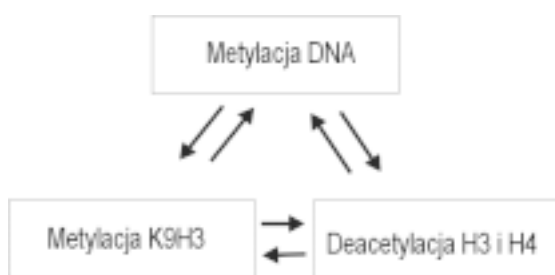
8. UDZIAŁ CZYNNIKÓW REMODULUJĄCYCH CHROMATYNĘ W METYLACJI DNA

Lsh (ang. *lymphoid specific helicase*) należy do rodziny SNF2, czynników remodelujących chromatinę, które zmieniają istniejące oddziaływania na poziomie DNA-histony, co umożliwia przesuwanie się nukleosomów względem DNA. Przekształcanie struktury chromatyny zmienia jej dostępność dla potencjalnych czynników transkrypcyjnych. Metylacja wysp CpG i modyfikacje histonów są konieczne do kondensacji chromatyny. Czynniki Lsh wykazuje preferencyjną asocjację z chromatiną przycentromerową, gdzie uczestniczy w metylacji sekwencji CpG. Delecja genu *Lsh* u myszy skutkuje akumulacją di- i trimetylowanej lizyny 4 w H3, natomiast nie powoduje zmian metylacji lizyny 9 histonu H3 jak i rozmieszczenia czynnika HP1. Podobny wzrost ilości metylowanej lizyny 4 w H3 następuje w przypadku traktowania komórek 5-azacytydyną (lub podawanie analogu tego związku zwierzętom), która powoduje demetylację genomu [71].

Gen *Lsh* jest bardzo aktywny w czasie embriogenezy, a delecja tego genu prowadzi do letalności okołoporodowej myszy [25, 70]. Efekt delecji *Lsh* wiąże się z wzrostem acetylacji histonów w obrębie sekwencji repetytywnych wchodzących w skład chromatyny przycentromerowej i reaktywacją ich aktywności transkrypcyjnej [25, 70]. Zniszczenie struktury heterochromatyny, przez długoterminowe działanie inhibitorem acetylacji histonów (trichostatyna A), wstrzymuje asocjację Lsh z przycentromerową chromatiną [70]. Można domniemywać, że Lsh wiąże się selektywnie wyłącznie z sekwencjami repetytywnymi [25].

Mutacje w genie *DDM1 A. thaliana* kodującym czynnik remodelujący chromatinę, będący odpowiednikiem ssaczego Lsh, prowadzą również do znacznego obniżenia poziomu metylacji cytozyny. Czynniki DDM1 działa jako regulator dostępności DNA i histonów dla wszelkiego typu modyfikacji [2].

9. DEACETYLACJA HISTONÓW POWODUJE METYLACJĘ DNA



RYCINA 4. Układ sprzężeń łączący trzy główne mechanizmy wyciszenia genów (wg [52] – zmodyfikowany)

Na ekspresję rybosomalnego DNA w jąderku u *Arabidopsis* wywierają wpływ deacetylazy histonów, takie jak HDT1 i HDA6 [19]. Enzymom tym przypisuje się wiele interakcji ze składnikami maszyny metylującej DNA. Są one powiązane z metylazami histonów i metylacją DNA i działają w układzie sprzężeń zwrotnych. Metylacja lizyny 9 histonu H3 powoduje deacetylację histonów i metylację cytozyny w DNA, deace-

tylacja histonów powoduje metylację DNA i metylację lizyny 9 H3, a metylacja DNA pociąga za sobą deacetylację histonów i metylację lizyny 9 histonu H3 (ryc. 4) [52].

10. PODSUMOWANIE

Związek metylacji DNA i modyfikacji histonów nie jest do końca poznany. Metylotransferazy DNA są jedynie częścią sprzężenia, które łączy modyfikacje DNA i modyfikacje chromatyny. W tym układzie istotne miejsce zajmują czynniki mogące modyfikować strukturę chromatyny wiążąc się do metylowanego DNA [21]. Na podstawie zgromadzonej wiedzy możemy rozważać kilka możliwych szlaków, w których różne struktury chromatyny wywołują kolejne następstwa i interakcje między czynnikami remodulującymi chromatynę, modyfikującymi histony, czy czynnikami pośredniczącymi w przekazywaniu sygnałów (np. HP1) i wreszcie metylującymi cytozynę w DNA (ryc. 4).

LITERATURA

- [1] ATTWOOD JT, YUNG RL, RICHARDSON BC. DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci* 2002; **59**: 241–257.
- [2] AUFSATZ W, METTE MF, VAN DER WINDEN J, MATZKE AJ, MATZKE M. RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 16499–16506.
- [3] BANISTER AJ, ZEGERMAN P, PARTRIDGE JF, MISKA EA, THOMAS JO, ALLSHIRE RC, KOUZARIDES T. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 2001; **410**: 120–124.
- [4] BARTEE L, MALAGNAC F, BENDER J. *Arabidopsis cmt3* chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing of an endogenous gene. *Genes Dev* 2001; **15**: 1753–1758.
- [5] BAYLIN SB, HERMAN JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000; **16**: 168–174.
- [6] BĄK D. RNAi – interferencja RNA – skuteczny sposób na ciszę. *Post Biochem* 2003; **49**: 136–146.
- [7] BÉCLIN C, BOUTET S, WATERHOUSE P, VAUCHERET H. A branched pathway for transgene-induced RNA silencing in plants. *Curr Biol* 2002; **12**: 684–688.
- [8] BIRD A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; **16**: 6–21.
- [9] BOURC'HIS D, BESTOR TH. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* 2004; **431**: 96–99.
- [10] BOURC'HIS D, XU GL, LIN CS, BOLLMAN B, BESTOR TH. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 2001; **294**: 2536–2539.
- [11] CAO X, SPRINGER NM, MUSZYNSKI MG, PHILLIPS RL, KAEPLER S, JACOBSEN SE. Conserved plant genes with similarity to mammalian *de novo* DNA methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 4979–4984.
- [12] CARMELL MA, XUAN Z, ZHANG MQ, HANNON GJ. The Argonaute family: Tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev* 2002; **16**: 2733–2742.
- [13] COSTELLO JF, PLASS C. Methylation matters. *J Med Genet* 2001; **38**: 285–303.
- [14] DALMAY T, HAMILTON A, RUDD S, ANGELL S, BAULCOMBE DC. An RNA dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 2000; **101**: 543–553.
- [15] FATAMI M, HERMANN A, GOWHER H, JELTSCH A. Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during *de novo* methylation of DNA. *Eur J Biochem* 2002; **269**: 4981–4984.

- [16] FINNEGAN EJ, KOVAC KA. Plant DNA methyltransferases. *Plant Mol Biol* 2000; **43**: 189–201.
- [17] FINNEGAN EJ, PEACOCK WJ, DENNIS ES. Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 8449–8454.
- [18] FREITAG M, LEE DW, KOTHE GO, PRATT RJ, ARAMAYO R, SELKER EU. DNA methylation is independent of RNA interference in *Neurospora*. *Science* 2004; **304**: 1939.
- [19] FREITAG M, SELKER EU. Controlling DNA methylation: many roads to one modification. *Curr Opin Genet Dev* 2005; **15**: 1–9.
- [20] FREITAG M, WILLIAMS RL, KOTHE GO, SELKER EU. A cytosine methyltransferase homologue is essential for repeat-induced point mutation in *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 8802–8807.
- [21] FUKS F, HURD PJ, WOLF D, NAN X, BIRD AP, KOUZARIDES T. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem* 2003; **278**: 4035–4040.
- [22] GOLL MG, BESTOR TH. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 2005; **74**: 481–514.
- [23] HALL IM, NOMA K, GREWAL SI. RNA interference machinery regulates chromosome dynamics during mitosis and meiosis in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 193–198.
- [24] HAMILTON AJ, VOINNET O, CHAPPELL L, BAULCOMBE D. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J* 2002; **21**: 4671–4679.
- [25] HUANG J, FAN T, YAN Q, ZHU H, FOX S, ISSAQ HJ, BEST L, GANGI L, MUNROE D, MUEGGE K. Lsh, an epigenetic guardian of repetitive elements. *Nucleic Acids Res* 2004; **32**: 5019–5028.
- [26] IRA G. Wyspy CpG – jedyne niezmetylowane odcinki DNA charakterystyczne dla promotorów genów kregowców. *Post Biochem* 1997; **43**: 189–198.
- [27] JACKSON JP, LINDROTH AM, CAO X, JACOBSEN SE. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* 2002; **416**: 556–560.
- [28] JACOBS SA, TAVERNA SD, ZHANG Y, BRIGGS SD, LI J, EISSENBERG JC, ALLIS CD, KHORASANI-ZADEH S. Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3. *EMBO J* 2001; **20**: 5232–5241.
- [29] JIA S, NOMA K, GREWAL SI. RNAi-independent heterochromatin nucleation by the stress-activated ATF/CREB family proteins. *Science* 2004; **304**: 1971–1976.
- [30] JONES L, HAMILTON AJ, VOINNET O, THOMAS CL, MAULE AJ, BAULCOMBE DC. RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell* 1999; **11**: 2291–2301.
- [31] JONES L, RATCLIFF F, BAULCOMBE DC. RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Curr Biol* 2001; **11**: 747–757.
- [32] KANKEL MW, RAMSEY DE, STOKES TL, FLOWERS S K, HAAG JR, JEDDELOH JA, RIDDLE NC, VERBSKY ML, RICHARDS EJ. *Arabidopsis MET1* cytosine methyltransferase mutants. *Genetics* 2003; **163**: 1109–1122.
- [33] KOUZMINOVA E, SELKER EU. *dim-2* encodes a DNA methyltransferase responsible for all known cytosine methylation in *Neurospora*. *EMBO J* 2001; **20**: 4309–4323.
- [34] LEHNERTZ B, UEDA Y, DERIJCK AA, BRAUNSCHWEIG U, PETERZ-BURGOS L, KUBICEK S, CHEN T, LI E, JENUWEIN T, PETERS AH. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol* 2003; **13**: 1192–1200.
- [35] LEI H, OH SP, OKANO M, JUTTERMANN R, GOSS KA, JAENISCH R, LI E. *De novo* DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development* 1996; **122**: 3195–3205.
- [36] LI Y, KIRSCHMANN DA, WALLRATH LL. Does heterochromatin protein 1 always follow code? *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **4**: 16462–16469.
- [37] LINDROTH AM, CAO X, JACKSON JP, ZILBERMAN D, McCALLUM CM, HENIKOFF S, JACOBSON SE. Requirement of CHROMOMETHYLASE 3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science* 2001; **292**: 2077–2080.
- [38] LLAVE C, KASSCHAU KD, RECTOR MA, CARRINGTON JC. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* 2002; **14**: 1605–1619.
- [39] MALLORY AC, REINHART BJ, BARTEL D, VANCE VB, BOWMAN LH. A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 15228–15233.
- [40] MATHIEU O, BENDER J. RNA-direct DNA methylation. *J Cell Sci* 2004; **117**: 4881–4888.

- [41] MOURRAIN P, BÉCLIN C, ELMAYAN T, FEUERBACH F, GODON C, MOREL JB, JOUETTE D, LACOMBE AM, NIKIC S, PICAULT N, REMOUE K, SANIAL M, Vo TA, VAUCHERT H. *Arabidopsis* *SGS2* and *SGS3* genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 2000; **101**: 533–542.
- [42] OKANO M, XIE S, LI E. Dnmt2 is not required for *de novo* and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 1998; **26**: 2536–2540.
- [43] OLSZEWSKA MJ. Podstawy cytogenetyki roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa 1999.
- [44] OLSZEWSKA MJ. Zmiany metylacji cytozyny podczas różnicowania komórek u roślin. *Post Biol Kom* 1999; **26** Supl.13: 83–93.
- [45] PÉLISSIER T, THALMEIR S, KEMPE D, SÄNGER HL, WASSENGGER M. Heavy *de novo* methylation at symmetrical and non-symmetrical sites is a hallmark of RNA-directed DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 1999; **27**: 1625–1634.
- [46] PETERS AH, MERMOUD JE, O'CARROLL D, PAGANI M, SCHWEIZER D, BROCKDORFF N, JENUWEIN T. Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin. *Nat Genet* 2002; **30**: 77–80.
- [47] PETERSON CL, LANIEL M-A. Histones and histone modifications. *Curr Biol* 2004; **14**: 546–551.
- [48] PETRIE VJ, WUITSCHICK JD, GIVENS CD, KOSINSKI AM, PARTRIDGE JF. RNA Interference (RNAi)-dependent and RNAi-independent association of the Chp1 chromodomain protein with distinct heterochromatic loci in fission yeast. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 2331–2346.
- [49] REIK W, DEAN W, WALTER J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001; **293**: 1089–1093.
- [50] REINHART BJ, BARTEL DP. Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science* 2002; **297**: 1831.
- [51] RICE JC, ALLIS CD. Histone methylation versus histone acetylation: new insight into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2001; **13**: 263–273.
- [52] RICHARDS EJ, ELGIN CR. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: runding up the usual suspects. *Cell* 2002; **108**: 489–500.
- [53] SAZE H, SCHEID OM, PASZKOWSKI J. Maintenance of CpG methylation is essential for epigenetic inheritance during plant gametogenesis. *Nat Genet* 2003; **34**: 65–69.
- [54] SHI Y, LAN F, MATSON C, MULLIGAN P, WHETSTINE JR, COLE PA, CASERO RA, SHI Y. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 2004; **119**: 941–953.
- [55] TAMARU H, SELKER EU. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* 2001; **414**: 277–283.
- [56] TAMARU H, SELKER EU. Synthesis of signals for *de novo* DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 2379–2394.
- [57] TANG G, REINHART BJ, BARTEL DP, ZAMORE PD. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev* 2003; **17**: 49–63.
- [58] TARIQ M, PASZKOWSKI J. DNA and histone methylation in plants. *Trends Genet* 2004; **20**: 244–251.
- [59] VAFA O, SULLIVAN KF. Chromatin containing CENP-A and α -satellite DNA is a major component of the inner kinetochore plate. *Curr Biol* 1997; **7**: 897–900.
- [60] VAISTIJ FE, JONES L, BAULCOMBE DC. Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. *Plant Cell* 2002; **14**: 857–867.
- [61] VERDEL A, JIA S, GERBER S, SUGIYAMA T, GYGI S, GREWAL SI, MOAZED D. RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* 2004; **303**: 672–676.
- [62] VERMAAK D, HAYDEN HS, HENIKOFF S. Centromere targeting element within the histone fold domain of Cid. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 7553–7556.
- [63] VOLPE TA, KIDNER C, HALL IM, TENG G, GREWAL SI, MARTIENSSEN RA. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 2002; **297**: 1833–1837.
- [64] WADA Y. Physiological function of plant DNA methyltransferases. *Plant Biotech* 2005; **22**: 71–80.
- [65] WANG MB, WESEY SV, FINNEGAN EJ, SMITH NA, WATERHOUSE PM. Replicating satellite RNA induces sequence-specific DNA methylation and truncated transcripts in plants. *RNA* 2001; **7**: 16–28.
- [66] WASSENGGER M, HEIMES S, RIEDEL L, SÄNGER HL. RNA directed *de novo* methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 1994; **76**: 567–576.

- [67] WUTZ A, SMARZKA OW, SCHWEIFER N, SCHELLANDER K, WAGNER EF, BARLOW DP. Imprinted expression of the *Igf2r* gene depends on an intronic CpG island. *Nature* 1997; **389**: 745–749.
- [68] XIE Z, JOHANSEN LK, GUSTAFSON AM, KASSCHAU KD, LELLIS AD, ZILBERMAN D, JACOBSEN SE, CARRINGTON JC. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol* 2004; **2**: 0642–0652.
- [69] YAN PS, PERRY MR, LAUX DE, ASARE AL, CALDWELL CW, HUANG TH. CpG island arrays: an application towards deciphering epigenetic signatures of breast cancer. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 1432–1438.
- [70] YAN Q, CHO E, LOCKETT S, MUEGGE K. Association of Lsh, a regulator of DNA methylation, with pericentromeric heterochromatin is dependent on intact heterochromatin. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 8416–8428.
- [71] YAN Q, HUANG J, FAN T, ZHU H, MUEGGE K. Lsh, a modulator of CpG methylation, is crucial for normal histone methylation *EMBO J* 2003; **22**: 5154–5162.
- [72] YODER JA, SOMAN NS, VERDINE GL, BESTOR TH. DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. *J Mol Biol* 1997; **18**: 385–395.
- [73] YODER JA, WALSH CP, BESTOR TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 1997; **13**: 335–340.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 04.10.2005 r.

Przyjęto: 20.10.2005 r.

Gagarina 9, 87 100 Toruń,

e-mail: stawski@biol.uni.torun.pl